



**ANNALES**

**CONFÉRENCE INTERNATIONALE  
SUR LES RAVAGEURS  
EN AGRICULTURE**

**INTERNATIONAL CONFERENCE  
ON PESTS IN AGRICULTURE**

**TOME III**

**7-8-9 décembre 1993**

**le Corum - Montpellier**

## ANPP - TROISIEME CONFERENCE INTERNATIONALE SUR LES RAVAGEURS EN AGRICULTURE

Montpellier - 7,8,9 Décembre 1993

### ***Bacillus thuringiensis* : SOUCHES NATURELLES ET INTERET DES BIOTECHNOLOGIES**

R. FRUTOS

BIOTROP-IGEPAM, CIRAD, 2477 Avenue du Val de Montferrand , B.P. 5035,  
34032 Montpellier Cedex 1

#### **RESUME**

Cette revue a pour objectif de rappeler les connaissances actuelles sur *Bacillus thuringiensis* qui est l'agent de lutte microbiologique le plus employé. Les caractéristiques propres aux toxines insecticides produites par cette bactérie seront présentées de même que diverses possibilités d'utilisation et d'amélioration par ingénierie génétique.

**Mots-clés :** *Bacillus thuringiensis* / Lutte microbiologique / Protéine insecticide / Ingénierie génétique / Organisme génétiquement modifié

#### **SUMMARY**

This review is aimed at presenting the current state of knowledge on *Bacillus thuringiensis* the most common microbiological control agent. The characteristics of *B. thuringiensis* insecticidal proteins will be described along with different means of use and possibilities of improvement through genetic engineering.

**Key-words :** *Bacillus thuringiensis* / Microbiological control / Insecticidal protein / Genetic engineering / Genetically modified Organism

## INTRODUCTION

La lutte contre les ravageurs des cultures constitue une activité essentielle à la survie de toute agriculture. Les pertes occasionnées aux cultures par des ravageurs sont considérables et il est impensable de ne pas utiliser des produits phytosanitaires pour protéger ces cultures.

L'évolution actuelle indique que les pesticides chimiques doivent faire face au problème du développement de résistance chez les populations de ravageurs cibles mais également à une inquiétude croissante de l'opinion publique en ce qui concerne les risques de pollution liés à l'emploi de molécules chimiques. La conséquence directe est une mise à l'index de certains produits en raison du danger que peut représenter leur manque de spécificité ou leur pouvoir de rémanence, mais également du fait de leur croissante inefficacité liée au développement de résistance. Dans un tel contexte, la recherche de moyens de lutte alternatifs, parmi lesquels figurent les agents de lutte biologique et plus précisément de lutte microbiologique, devient une nécessité.

Le problème majeur est qu'à l'heure actuelle peu d'agents de lutte sont commercialement disponibles. En effet, parmi les moyens de lutte contre les ravageurs, les insecticides chimiques représentent l'écrasante majorité de l'arsenal actuellement disponible avec en 1991 une part du marché mondial équivalente à 98,4 %. Le 1,6% restant est bien entendu constitué par l'ensemble des produits de lutte biologique parmi lesquels les produits à base de *Bacillus thuringiensis* représentent 90 à 95 % (Rigby, 1991). Une évolution à la hausse de ce marché des produits à base de *B. thuringiensis* est prévue jusqu'à la fin du siècle avec une augmentation annuelle estimée à 20 % (Rigby, 1991).

*B. thuringiensis* représentant donc l'essentiel des moyens de lutte microbiologique, cette revue sera axée sur cette bactérie et son potentiel en tant qu'outil de lutte. Cependant, tout moyen de contrôle des ravageurs se doit pour être efficace d'être employé dans un cadre précis en s'entourant de précautions permettant d'éviter une perte d'efficacité rapide du produit essentiellement à cause de résistances.

## LES $\delta$ -ENDOTOXINES DE *B. thuringiensis*

L'activité insecticide de *B. thuringiensis* est liée à la production par cette bactérie de  $\delta$ -endotoxines. Analyser le pouvoir insecticide de *B. thuringiensis* reviendra donc à étudier les  $\delta$ -endotoxines, les gènes correspondants et le contrôle de l'expression de ces gènes. Il convient avant de discuter des caractéristiques des  $\delta$ -endotoxines de présenter brièvement la bactérie elle-même.

*B. thuringiensis* est une bactérie à Gram positif, sporulante, longtemps considérée comme une bactérie du sol mais dont il a été suggéré récemment qu'elle pourrait en fait être une bactérie de la frondaison (Smith et Couche, 1991).

Le premier système mis en place pour différencier les souches de *B. thuringiensis* était une caractérisation sérologique basée sur la reconnaissance d'un antigène flagellaire. Bien que cette technique, toujours en usage, ait permis de différencier 34 sérotypes différents (De Barjac et Frachon, 1990 ; IEBC, 1992), elle ne permet pas de définir des pathotypes et un autre mode de discrimination, basé sur la spécificité et la structure des  $\delta$ -endotoxines, a été proposé afin de pallier à cette carence (Höfte et Whiteley, 1989).

## STRUCTURE

L'activité insecticide de *B. thuringiensis* est liée à la présence d'un corps d'inclusion parasporal, communément appelé le "cristal", formé durant le cycle végétatif de la bactérie parallèlement à la production d'une forme de résistance, la spore. Le cristal est composé de protéines en quantité et en qualité variables selon la souche bactérienne (Höfte et Whiteley, 1989). Les gènes codant pour ces différentes toxines sont divisés en deux catégories, les gènes de type *cry*, nommés ainsi par référence au cristal (protéines de type Cry) et les gènes de type *cyt*, dénomination liée au caractère cytolytique des protéines de type Cyt. Les gènes *cry* présentent de nombreuses similitudes structurales et sont regroupés en quatre catégories selon leur spécificité :

- gènes *cryI* : Lépidoptères
- gènes *cryII* : Lépidoptères et Diptères
- gènes *cryIII* : Coléoptères
- gènes *cryIV* : Diptères

Les gènes du groupe *cyt* (*cytA* et *cytB*) codent pour des protéines de petite taille (27 kDa) qui ne semblent pas présenter d'activité insecticide mais qui montrent une activité cytolytique forte et non spécifique (Thomas et al., 1983 ; Ward et Ellar, 1986). Les protéines constitutives du cristal sont en règle générale des protoxines qui n'acquièrent leur caractère insecticide qu'après une digestion protéolytique dans le tube digestif de l'insecte, processus d'activation, et libération d'une sous-unité toxique. Depuis la mise au point de cette classification d'autres catégories ont été créées par différents auteurs afin de caractériser de nouvelles activités. Le type CryV a été suggéré pour une toxine à double activité anti-lépidoptère / anti-coléoptère (Tailor et al., 1992). Cependant ce même CryV, ainsi que CryVI, a été proposé pour définir des toxines actives contre des nématodes (Feitelson et al., 1992). De nouveaux éclaircissements devront par conséquent être apportés afin de clarifier ces apports récents à la classification des types de toxines. Tous les nouveaux types de toxines n'ont cependant pas été nommés. En effet, les gènes de deux protéines du cristal d'une taille de 34 et 40 kDa (Brown et Whiteley, 1992) ont été décrits récemment et bien que leur séquence soit totalement différente de celles déjà connues aucun nom n'a encore été suggéré. Ceci montre non seulement que le spectre d'hôte de *B. thuringiensis* peut s'étendre bien au delà des lépidoptères mais également que de nouvelles spécificités sont susceptibles d'être découvertes.



La structure des toxines et des gènes correspondants varie selon le type. Les protéines de type CryI sont des protoxines d'une taille de 130 à 140 kDa activées *in vivo* en sous-unités toxiques de 60 à 70 kDa. Cette sous unité toxique est subdivisée en deux domaines différents, un premier domaine conservé qui serait impliqué dans la formation d'un pore dans la membrane cellulaire et un second domaine beaucoup plus variable qui pourrait lui être impliqué dans la reconnaissance d'un site d'accrochage au niveau du tube digestif de l'insecte. Une telle structuration en plusieurs domaines a été confirmée par la détermination de la structure tridimensionnelle de la protéine CryIIIa (Li *et al.*, 1991).

## MODE D'ACTION

Le mode d'action des toxines de *B. thuringiensis*, qui serait le même pour toutes les toxines de type Cry, correspond en fait à une succession de plusieurs étapes clés (Höfte et Whiteley, 1989). Dans un premier temps, le cristal est dissout dans le tube digestif de l'insecte essentiellement en raison du pH du suc digestif ce qui entraîne la libération des protéines qui le constituent. Ces protéines sont, pour la majorité d'entre elles, activées *in vivo* par des protéases du suc digestif libérant ainsi la sous-unité active. Cette sous-unité vient se fixer alors sur un site d'accrochage présent à la surface de la membrane des cellules du tube digestif (Hoffmann *et al.*, 1988 ; Van Rie *et al.*, 1990a). Ce site d'accrochage spécifique serait reconnu par le domaine variable de la toxine, c'est à dire la moitié C-terminale. La dernière étape est la création d'un pore non sélectif dans la cellule cible entraînant une cytolysse (Knowles et Ellar, 1987). Peu de choses ont été clairement définies à ce niveau du processus d'action de la toxine et plusieurs modèles pouvant expliquer la formation du pore sont actuellement proposés sans que l'on sache encore lequel correspond à la réalité. Il a été montré récemment que les toxines de *B. thuringiensis* pouvaient déclencher des mécanismes de signalisation intracellulaire (calcium et pH) dans les cellules suggérant une possible activation du récepteur (Garneau *et al.*, 1992 ; Schwartz *et al.*, 1991). Ces toxines sont en outre capables de former des pores ioniques sur des bicouches lipidiques, donc en l'absence de tout récepteur, confirmant ainsi l'hypothèse selon laquelle les deux domaines formant la sous-unité toxique seraient relativement indépendants l'un de l'autre (Schwartz *et al.*, 1992 ; Convents *et al.*, 1990 ; Choma et Kaplan, 1990).

## RESISTANCE

Si *B. thuringiensis* a pendant quelque temps été considéré comme insensible au développement de résistance du fait de son utilisation sans conséquence pendant des années, on sait désormais qu'il n'en est rien. Des résistances aux toxines de *B. thuringiensis* ont été reportées aussi bien au champ qu'en laboratoire (Mc Gaughey, 1990 ; Tabashnik *et al.*, 1990). La résistance aux toxines de *B. thuringiensis* est due à la modification du récepteur reconnu par la toxine sous l'action de la pression de sélection (Van Rie *et al.*, 1990b). La toxine n'étant plus capable de se fixer sur ce récepteur, l'étape suivante, la formation du pore, ne peut se réaliser et la toxine bien qu'activée correctement et fonctionnelle est désormais dans l'impossibilité de remplir sa fonction. La confirmation de

l'existence de résistances a eu pour conséquence une remise en cause du mode d'utilisation de *B. thuringiensis* et plusieurs stratégies ont été proposées. Les réflexions en cours ont conduit à développer plusieurs modèles permettant de comparer l'impact d'épandages ou de plantes transgéniques sur le développement de résistances (Roush, 1989 ; Marrone et McIntosh, 1993). Selon la biologie de l'insecte cible, une alternance de produits différents serait dans certains cas plus intéressante alors que dans d'autres cas une combinaison serait plus favorable. Tous cependant sont unanimes sur le fait qu'un ralentissement du développement de résistances ne sera possible que si la pression de sélection sur l'insecte est maintenue au plus bas.

## PRODUITS DISPONIBLES

Les produits à base de *B. thuringiensis* actuellement disponibles sur le marché sont, pour l'essentiel, des souches naturelles produites en fermenteur et formulées différemment en fonction du type d'habitat de l'insecte cible. Ces produits se présentent sous la forme de poudres, ou de boues qui après dilution peuvent être épandues sur des champs ou des forêts ou encore de granulés ou, par exemple pour le contrôle de larves de moustiques, sous forme de plaquettes permettant une libération progressive des cristaux dans l'eau (Rigby, 1991).

Ces produits basés sur des souches naturelles ne seront désormais plus les seuls à être disponibles sur le marché. La société Mycogen a développé sous le nom de CellCap® une stratégie de production de toxines de *B. thuringiensis* dans une souche recombinante de *Pseudomonas fluorescens* tuée après production du cristal. L'avantage procuré par cette stratégie CellCap® est la production de cristaux, représentant 10 à 20 % du poids de protéine de la bactérie, dans des bactéries entières qui contrairement à *B. thuringiensis* ne libèrent pas des cristaux en fin de cycle. Ceci permet une protection des cristaux contre les rayons ultraviolets, avec pour conséquence une augmentation de la durée de vie des cristaux d'un facteur 3 à 4. Crop Genetics International Corporation a quant à elle développé, sous le nom de InCide®, une souche recombinante de *Clavibacter xyli* endophyte du maïs se développant dans la plante et exprimant un gène de toxine de *B. thuringiensis*, assurant ainsi une protection contre *Ostrinia nubilalis*. Des essais au champ sont actuellement en cours pour déterminer le potentiel d'utilisation de ce produit. Un des gros avantages de ce produit est de pouvoir délivrer des toxines à un ravageur attaquant une plante sans épandage et sans avoir à développer des variétés transgéniques.

## PERSPECTIVES

La découverte régulière de nouvelles spécificités d'hôtes chez des souches naturelles de *B. thuringiensis*, de même que la description de nouveaux gènes de toxines indiquent que les potentialités de cet agent de lutte ne sont pas encore épuisées. Dans un tel contexte les programmes de criblage initiés par plusieurs grandes sociétés prennent tout leur sens et sont d'ailleurs à l'origine de la découverte de nouvelles activités. Des criblages sur des ravageurs contre lesquels

aucune souche active de *B. thuringiensis* n'est connue devraient donc être poursuivis dans l'avenir. De tels programmes étant à l'origine de la découverte de nouvelles souches, la mise sur le marché de certaines d'entre elles pourrait intervenir dans un futur proche.

Outre la recherche et l'emploi de souches naturelles de *B. thuringiensis*, il existe d'autres voies d'amélioration des produits au travers de stratégies impliquant les biotechnologies. Les améliorations qui sont apportées concernent l'optimisation du ciblage des toxines en fonction de l'habitat et de la biologie de l'insecte cible ou l'élargissement du spectre d'hôte par la combinaison de plusieurs toxines de spécificités différentes.

Les travaux visant à optimiser le ciblage des produits à base de *B. thuringiensis* utilisent des organismes génétiquement modifiés pour produire des toxines de *B. thuringiensis*, dont la biologie permet un contact avec l'espèce cible. Un exemple de ce type d'approche est donné par InCide® de CGI, où une souche de *Clavibacter* de par son caractère endophyte est capable de délivrer des toxines à *O. nubilalis* lorsque cette dernière se nourrit sur le maïs ingérant ainsi des bactéries transformées. D'autres essais de transformation de micro-organismes ont été tentés. Des algues et des cyanobactéries ont été modifiées afin de produire des toxines de type CryIV, c'est à dire actives contre les larves de moustique (Gelernter et Schwab, 1993). L'avantage d'un tel système réside dans le fait que les micro-organismes transformés font partie du régime alimentaire des larves de moustique et surtout restent à la surface de l'eau contrairement aux formulations à base de *B. thuringiensis* qui avec le temps se déposent au fond hors d'atteinte des insectes cibles. Toujours dans le cadre de l'utilisation de micro-organismes transformés, des souches de *Pseudomonas fluorescens*, de *P. cepacia* ou de *Bradyrhizobium* colonisant les racines ont été utilisées pour produire des toxines de *B. thuringiensis* (Gelernter et Schwab, 1993). Une telle stratégie permettrait d'assurer une protection contre des ravageurs s'attaquant au système racinaire. Ce type d'approche bien que très séduisant présente quand même un inconvénient majeur. Il nécessite l'emploi de micro-organismes génétiquement modifiés vivants, ce qui pourraient présenter des difficultés d'un point de vue légal ou simplement pourrait être mal accepté par l'opinion publique. Il sera donc, plus que jamais, nécessaire de démontrer formellement l'innocuité de ce type de produit, surtout en terme d'échappement de gène, avant d'envisager une utilisation à grande échelle.

Un autre moyen de délivrer des toxines de *B. thuringiensis* spécifiquement aux ravageurs est l'emploi de plantes transgéniques. Cette technique ne sera pas développée dans cette revue étant donnée quelle est traitée par ailleurs durant cette conférence.

L'élargissement du spectre d'hôte est également possible par le biais des biotechnologies. Une culture étant fréquemment menacée par plusieurs types de ravageurs il peut être très utile de posséder une souche de *B. thuringiensis* active contre deux ravageurs très différents comme par exemple un lépidoptère et un coléoptère. Une telle stratégie est illustrée par un produit développé par la société Ecogen, baptisé Foil®. Ce produit, actif à la fois contre un lépidoptère et un



coléoptère, a été obtenu par l'introduction d'un plasmide porteur du gène *cryIIIA* codant pour une toxine anti-coléoptère dans une souche de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* déjà active contre un lépidoptère. Ce transfert de plasmide, obtenu dans le cas présent *in vitro*, correspond à un phénomène existant naturellement, le transfert de plasmides d'une souche à une autre ayant été démontré (Jarrett et Stephenson, 1990 ; Reddy *et al.*, 1987). Ces produits pourraient donc être considérés comme issus des biotechnologies mais en reproduisant un phénomène naturel et sans utilisation des techniques de l'ADN recombinant, ce qui pourrait faciliter leur homologation.

Les produits décrits précédemment sont soit déjà homologués, soit en cours d'évaluation et par conséquent sont déjà largement sortis du cadre du laboratoire ce qui n'est pas encore le cas des produits basés sur la modification des gènes de toxines. De nombreux travaux ont été entrepris et continuent pour délimiter les régions impliquées dans la spécificité et dans la toxicité dans le but de modifier les gènes de toxines afin d'augmenter l'efficacité ou d'élargir le spectre d'hôte. Toutefois de nombreux travaux sont encore nécessaires pour comprendre la relation structure-fonction des toxines de *B. thuringiensis*. Il est nécessaire d'élucider en priorité le mode d'action à l'échelle de l'interaction avec la membrane cellulaire, de même qu'il est nécessaire de définir les conséquences sur le fonctionnement de la cellule de la fixation sur le récepteur. Il faut préciser que la nature exacte du (ou des) récepteur (s) en question n'est pas encore connue. De nombreuses informations doivent encore être accumulées et confrontées pour que des gènes modifiés puissent être efficacement utilisés. L'ingénierie génétique pourra fort probablement apporter un appui important au développement de nouveaux agents de lutte, mais à condition à la fois de ne pas considérer cette discipline comme une source de miracles et d'utiliser ses produits dans le cadre d'une lutte intégrée contre les ravageurs. Il faut enfin prendre conscience que le développement de tels produits est soumis à des contraintes très strictes et qu'ils sont testés sévèrement en ce qui concerne leur innocuité pour l'environnement et leur conformité à la réglementation. Il est important de réaliser que tout n'est pas permis et qu'une attention toute particulière est accordée à la sécurité et à l'innocuité des produits issus des biotechnologies.

## REFERENCES

- Brown, K. L., and H.R. Whiteley. 1992. Molecular characterization of two novel crystal protein genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *thompsoni*. *J. Bacteriol.* 174, 549-557.
- Choma C.T. et H. Kaplan. 1990. Folding and unfolding of the protoxin from *Bacillus thuringiensis* : evidence that the toxic moiety is present in an active conformation. *Biochemistry* 29, 10971-10977.
- Convents D., C. Houssier, I. Lasters et M. Lauwereys. 1990. The *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin : Evidence for a two domain structure of the minimal toxic fragment. *The Journal of Biological Chemistry* 265, 1369-1375.



De Barjac H. et E. Frachon. 1990. Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. Entomophaga 35, 233-240.

Feitelson, J.S., Payne, J. et Kim, L. 1992. *Bacillus thuringiensis* : Insects and beyond. Bio/Technology 10, 271-275.

Garneau L., Paradis, M.J., Masson L., Brousseau, R., Schwartz J.L. et Laprade R. 1992. Early effects of the toxin of *Bacillus thuringiensis* on *Spodoptera frugiperda* cells results in loss of intracellular pH regulation. Biophysical Journal 61, 227a

Gelernter W. et G.E. Schwab. 1993. Transgenic bacteria, viruses, algae and other microorganisms as *Bacillus thuringiensis* toxin delivery system. p 89-104. In "*Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide : theory and practice". Entwistle P.F., J.S. Cory, M.J. Bailey et S. Higgs ed. John Wiley and Son, Chichester, UK.

Hoffmann, C., H. Vanderbruggen, H. Höfte, J. Van Rie, S. Jansen et H. Van Mellaert. 1988. Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta endotoxin is correlated with the presence of high-affinity sites in the brush border membrane of target insect midguts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 7844-7848.

Höfte H. et H.R. Witheley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Rev. 53, 242-255.

IEBC. 1992. Collection of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* (classified by H serotypes). Catalogue n°1. Institut Pasteur ed.

Jarrett P. et M. Stephenson. 1990. Plasmid transfer between strains of *Bacillus thuringiensis* infecting *Galleria mellonella* and *Spodoptera littoralis*. Appl. Env. Microbiol. 56 : 1608-1614.

Knowles B.H. et D.J. Ellar. 1987. Colloïd-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins with different insect specificities. Biochim. Biophys. Acta 924, 509-518.

Li, J., J. Carroll et D.J. Ellar., 1991. Crystal structure of insecticidal  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2-5 Å resolution. Nature 353, 815-821.

Marrone P.G. et S.C. MacIntosh. 1993. Resistance to *Bacillus thuringiensis* and resistance management. p 221-235. In "*Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide : theory and practice". Entwistle P.F., J.S. Cory, M.J. Bailey et S. Higgs ed. John Wiley and Son, Chichester, UK.

McGaughey, W.H. 1990. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. New Directions in Biological control: Alternatives for suppressing Agricultural Pests and diseases. Alan R. Liss, Inc. pp. 583-598.

Reddy A., L. Battisti et C.B. Thorne. 1987. Identification of self-transmissible plasmids in four *Bacillus thuringiensis* subspecies. J. Bacteriol. 169 : 5263-5270.

Rigby S. 1991. *Bt* in crop protection. AGROW ed. 167 p. PJB Publication Ltd, Richmond, UK.

Rouch R. 1989. Designing resistance management programs : how can you choose ? Pestic. Sci. 26, 423-441.

Schwartz JL, Garneau L, Masson L et Brousseau R 1991. Early response of cultured lepidopteran cells to exposure to  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* : involvement of calcium and anionic channels. Biochimica Biophysica Acta 1065, 250-260

Schwartz JL, Garneau L, Savaria D, Masson L et Brousseau R and Rousseau R. 1993. Lepidopteran-specific crystal toxins from *Bacillus thuringiensis* form anion- and cation-selective ion channels in planar lipid bilayers. J. Membrane Biol. 132, 53-62.

Smith R.A. et G.A. Couche. 1991. The Phylloplane as a source of *Bacillus thuringiensis* variants. Appl. Env. Microbiol. 57, 311-315.

Tabashnik, B.E., N.L. Cushing, N. Finson, and M.W. Johnson. 1990. Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (*Lepidoptera* : *Plutellidae*). J. Econ. Entomol. 83, 1671-1676.

Tailor R., J. Tippet, G. Gibbs, S. Pells, D. Pike, L. Jordan et S. Ely. 1992. Identification and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin entomocidal to coleopteran and lepidopteran larvae. Mol. Microbiol. 6, 1211-1217.

Thomas W.E. et D.J. Ellar. 1983. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal  $\delta$ -endotoxin : Effect on insect and mammalian cells in vitro and in vivo. J. Cell Sci. 60, 181-197.

Van Rie, J., S. Jansen, H. Höfte, D. Degheele et H. Van Mellaert. 1990a. Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. Appl. Environ. Microbiol. 56, 1378-1385.

Van Rie, J., W.H. McGaughey, D.E. Johnson, B.D. Barnett et H. Van Mellaert. 1990b. Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. Science 247, 72-74.

Ward E.S. et D.J. Ellar. 1986. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* delta-endotoxin : nucleotide sequence and characterization of the transcripts in *Bacillus thuringiensis* and *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 191, 1-11.